

Patent Attorney  
Docket No. 81839

BEST AVAILABLE COPY

1646

TRANSMITTAL LETTER

Inventors: Michael Niederweis et al.

Serial No: 10/070,099

Date filed: February 28, 2002

Confirmation No.

For: METHOD FOR PRODUCING A CHANNEL-FORMING PROTEIN

Group Art Unit: 1646

Examiner: Unknown

Date Due:

Box Non-Fee Amendment  
Commissioner for Patents  
Washington, D. C. 20231

RECEIVED

NOV 20 2002

TECH CENTER 1600/2900

Dear Sir:


Transmitted herewith for the above-identified patent application are the following:

- A Transmittal of Certified Copies
- Certified copy of German Application No. 199 41 416.5
- Certified copy of German Application No. 199 43 520.0
- A return postcard

The item(s) checked below are appropriate:

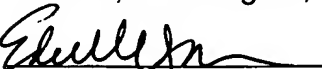
1. ☐ Applicant(s) hereby petitions for a one ( ) month extension of time to respond to an dated
2. ☒ Please charge any fees or costs not accounted for to Deposit Account No. 11-1755.
3. ☐ Applicant is a small entity.

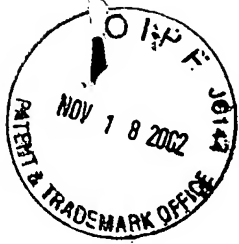
Date: November 12, 2002

  
Edward M. Kriegsman  
Reg. No. 33,529

KRIEGSMAN & KRIEGSMAN  
665 Franklin Street  
Framingham, MA 01702  
(508) 879-3500

I hereby certify that this correspondence is being deposited with the United States Postal Service as first class mail in an envelope addressed to: Box Non-Fee Amendment, Commissioner for Patents, Washington, D. C. 20231 on November 12, 2002

  
Edward M. Kriegsman



PATENT  
Attorney Docket No. 81839

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Application of: )  
MICHAEL NIEDERWEIS ET AL. )  
Serial No.: 10/070,099 )  
Filed: February 28, 2002 )  
For: METHOD FOR PRODUCING A )  
CHANNEL-FORMING PROTEIN )

Group Art Unit: 1646

Examiner: Unknown

RECEIVED  
NOV 20 2002  
TECH CENTER 1600/2900

Box Non-Fee Amendment  
Assistant Commissioner for Patents  
Washington, D.C. 20231

Sir:

TRANSMITTAL OF CERTIFIED COPIES

Enclosed herewith please find certified copies of the following foreign applications from  
which priority is claimed for this case:

Country: Germany  
Application Number: 199 41 416.5  
Filing Date: August 31, 1999

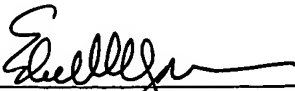
Country: Germany  
Application Number: 199 43 520.0  
Filing Date: September 11, 1999

If there are any fees due in connection with the filing of this paper that are not accounted for,  
the Examiner is authorized to charge the fees to our Deposit Account No. 11-1755. If a fee is

required for an extension of time under 37 C.F.R. 1.136 that is not accounted for already, such an extension of time is requested and the fee should also be charged to our Deposit Account.

Respectfully submitted,


Kriegsman & Kriegsman

By: 

Edward M. Kriegsman  
Reg. No. 33,529  
665 Franklin Street  
Framingham, MA 01702  
(508) 879-3500

Dated: November 12, 2002

I hereby certify that this correspondence is being deposited with the United States Postal Service as first class mail in an envelope addressed to: Box Non-Fee Amendment, Commissioner for Patents, Washington, D.C. 20231 on November 12, 2002



Edward M. Kriegsman  
Reg. No. 33,529

Dated: November 12, 2002



# BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



RECEIVED

NOV 20 2002

TECH CENTER 1600/291

## Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

**Aktenzeichen:**

199 41 416.5

**CERTIFIED COPY OF  
PRIORITY DOCUMENT**

**Anmeldetag:**

31. August 1999

**Anmelder/Inhaber:**

Dr. Michael Niederweis,  
Erlangen/DE;  
Dr. Stefan Bossmann,  
Karlsruhe/DE.

**Bezeichnung:**

Verfahren zur Herstellung eines kanalbildenden  
Proteins

**IPC:**

C 07 K, C 12 N

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 31. Oktober 2002  
**Deutsches Patent- und Markenamt**  
**Der Präsident**  
Im Auftrag



25

### Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung eines bildenden Proteins aus einem Gram-positiven Bakterium, wobei  
5 das kanalbildende Protein durch Expression aus E.coli gewonnen wird.

## Verfahren zur Herstellung eines kanalbildenden Proteins

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung eines kanalbildenden Proteins, ein kanalbildendes Protein, ein Gen und ein mutiertes mspA-Gen, einen Plasmidvektor und ein Überexpressionssystem.

Die Erfindung betrifft allgemein das technische Gebiet der Herstellung von Nanostrukturen. Zu den bisher am besten charakterisierten Nanostrukturen gehören Kohlenstoff-Nanokanäle (Yakobson, B. I. and Smalley, R. E. Fullerene nanotubes: C<sub>1,000,000</sub> and beyond. Am Sci 85, 324, 1997). Mit Kohlenstoff-Nanokanälen konnte gezeigt werden, daß die elektronischen Eigenschaften durch ihre strukturellen Details kontrolliert werden. Die Synthese von Kohlenstoff-Nanokanälen erfolgt durch verschiedene Varianten von CVD (chemical vapor deposition) (Fan, S., Chapline, M. G., Franklin, N. R., Tomblor, T. W., Cassell, A. M. and Dai, H. Self-oriented regular arrays of carbon nanotubes and their field emission properties. Science 283, 512-4, 1999) und ist damit sehr aufwendig.

Aus Johnson, S. A., Ollivier, P. J. and Mallouk, T. E. Ordered mesoporous polymers of tunable pore size from colloidal silica templates. Science 283, 963-965 (1999) ist ein Verfahren zur Herstellung von organischen Nanokanälen auf der Grundlage eines Templates bekannt. Damit können Nanokanäle mit einem Durchmesser von 5 bis 35 nm hergestellt werden.

Mycobakterien gehören zu einer Untergruppe von Gram-positiven Bakterien, die Mycolsäuren besitzen und die die Gattungen Corynebacterium, Nocardia, Rhodococcus, Gordona, Tsukamurella, Dietzia einschließen.

2

Trias, J. and Benz, R. Permeability of the cell wall of *Mycobacterium smegmatis*. *Mol Microbiol* 14, 283-290 (1994) beschreiben kanalbildende Proteine, nämlich Porine in der Mycolsäure-Schicht von Mycobakterien. Biochemische oder molekulargenetische Daten über diese Porine wurden bisher nicht veröffentlicht.

Aus Lichtinger, T., Burkovski, A., Niederweis, M., Kramer, R. and Benz, R. Biochemical and biophysical characterization of the cell wall porin of *Corynebacterium glutamicum*: the channel is formed by a low molecular mass polypeptide. *Biochemistry* 37, 15024-32 (1998) ist ein Verfahren zur Präparation von Porinen aus Corynebakterien bekannt. Dieses Verfahren ist relativ ineffizient.

Mukhopadhyay, S., Basu, D. and Chakrabarti, P. Characterization of a porin from *Mycobacterium smegmatis*. *J Bacteriol* 179, 6205-6207 (1997) beschreiben die Extraktion von Porin aus *M. smegmatis* mit einem Puffer mit 1 % Zwittergent durch Inkubation bei Raumtemperatur für eine Stunde. Die Ausbeuten waren schlecht und die Verunreinigung mit anderen Proteinen groß.

Aufgabe der Erfindung ist es, die Nachteile nach dem Stand der Technik zu beseitigen. Es soll insbesondere ein einfaches und schnelles Verfahren mit verbesserter Ausbeute zur Herstellung kanalbildender Proteine angegeben werden. Die kanalbildenden Proteine sollen insbesondere zur Herstellung von Nanostrukturen geeignet sein.

Diese Aufgabe wird durch die Merkmale der Ansprüche 1, 23 bis 31 gelöst. Zweckmäßige Weiterbildungen ergeben sich aus den Merkmalen der Ansprüche 2 bis 22 sowie ggf. 27 und 28.

3

Nach Maßgabe der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung eines in Gram-positiven Bakterien vorkommenden kanalbildenden Proteins vorgesehen, wobei das kanalbildende Protein durch heterologe Expression oder durch Aufreinigung aus Mycobakterien gewonnen wird.

Unter den kanalartigen Proteinen werden solche Proteine verstanden, die natürlicherweise insbesondere in der Zellwand der Gram-positiven Bakterien vorkommen.

10

Das erfindungsgemäße Verfahren ist wesentlich effizienter als die bisher beschriebenen Verfahren, bietet die Möglichkeit einer weitgehenden Automatisierung der chromatographischen Aufreinigung und ermöglicht eine drastisch erhöhte Ausbeute.

15

Das Gram-positive Bakterium kann ein mindestens eine Mycolsäure enthaltendes Bakterium sein. Nach einer Ausgestaltung ist das Bakterium ein Mykobakterium, vorzugsweise *Mycobacterium smegmatis*.

20

Das kanalbildende Protein kann ein Porin sein. Bevorzugt wird ein Porin, das gegenüber organischen Lösungsmitteln chemisch stabil und/oder bis zu einer Temperatur von 80°C, vorzugsweise 100°C thermisch stabil ist.

25

Das Porin ist vorzugsweise MspA. Dieses Protein eignet sich wegen seinen überraschenden chemischen und thermischen Stabilität besonders gut zur Herstellung von Nanostrukturen.

30

Eine gut Ausbeute wird erzielt, wenn die heterologe Expression in *E.coli* durchgeführt wird. Zur weiteren Erhöhung der Ausbeute kann das kanalbildende Protein durch Überexpression, vorzugsweise aus *E.coli* oder Mycobakterien, gewonnen werden. Zweckmäßigerweise wird zur Expression ein für ein kanalbil-

4

dendes Protein, vorzugsweise ein Porin, codierendes Gen benutzt wird. Vorteilhaft ist es weiter, daß zur Überexpression ein mspA-Gen gemäß Sequenz 1 (siehe unten) benutzt wird. zur Expression kann insbesondere aber auch ein von der Sequenz 1 abgeleitetes mutiertes Gen benutzt werden, wobei die Mutation so ausgebildet ist, daß die chemische und thermische Stabilität sowie die kanalartige Struktur des exprimierten Proteins im wesentlichen denen von MspA entspricht. Die Mutation kann auch im wesentlichen in einer Angleichung der Codons von mspA an die Codons der in *E.coli* hoch exprimierenden Gene bestehen. Zur Überexpression kann auch ein mutiertes mspA-Gen benutzt werden, wobei die Mutation im wesentlichen darin besteht, daß der GC-Gehalt auf weniger als 66% vermindert ist. Die Anpassung der Codon-Benutzung verbessert die Überexpression von MspA in *E.coli* erheblich.

Durch Herstellung des kanalbildenden Proteins MspA aus *E. coli* kann die Ausbeute gegenüber dem oben beschriebenen Verfahren zur Präparation des nativen Proteins noch einmal um den Faktor 10 bis 20 gesteigert werden.

Es hat sich als vorteilhaft erwiesen, zur Überexpression das synmspA-Gen gemäß Sequenz 4 zu benutzen. Dazu kann ein zur Überexpression in *E.coli* geeigneter Vektor verwendet werden, in den das synmspA-Gen gemäß Sequenz 4 eingesetzt ist. Solche geeigneten Vektoren sind z.B. von Hannig, G. und Makrides, S.C. in Trends in Biotechnology, 1998, Vol. 16, pp54 beschrieben. Der Offenbarungsgehalt dieses Dokuments wird hiermit einbezogen.

30

Es hat sich weiter als vorteilhaft erwiesen, das kanalbildende Proteine mittels nicht-ionischer oder zwitterionischer Detergentien aus der Zellwand von Gram-positiven Bakterien zu gewinnen. Die Detergentien können aus der folgenden Gruppe

5

ausgewählt sein: Isotridecylpoly(ethyleneglycolether)<sub>n</sub>, Alkylglucoside, besonders Octylglucosid, Alkylmaltoside, besonders Dodecylmaltosid, Alkylthiogluco-  
 side, besonders Octylthiogluco-  
 sid, Octyl-Polyethylenoxide und Lauryldiamminoxid.

- 5 Es ist zweckmäßigerweise eine zweifache kritischer micellarer Konzentration (CMC) in einem Phosphatpuffer (100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 6.5, 150 mM NaCl) eingestellt worden. - Die zwitterionischen und nicht-ionischen Detergentien lösen insbesondere das kanalbildende Protein MspA sehr selektiv und  
 10 mit guter Ausbeute aus der Zellwand von *M. smegmatis*.

- Es hat sich weiter als zweckmäßig erwiesen, daß die Temperatur bei der Extraktion zwischen 80 und 110 °C, vorzugsweise zwischen 90 und 100 °C, und/oder die Extraktionszeit 5 bis  
 15 120 Minuten, vorzugsweise 25 - 35 Minuten, beträgt. Vorteilhaft ist weiter die Benutzung eines Puffers mit einer Ionenstärke von mehr als 50 mM NaCl oder Na-Phosphat.

- Insbesondere eine Durchführung der Extraktion bei 100 °C die  
 20 Verwendung eines Puffers mit hoher Ionenstärke sowie zwitterionischer und nicht-ionischer Detergentien verbessern das Extraktionsverfahren für Porine aus *Mycobacterium smegmatis*. Es bietet gegenüber den bisherigen Verfahren zur Aufreinigung solcher Proteine mit Hilfe organischer Lösungsmittel oder der  
 25 Extraktion bei Raumtemperatur folgende Vorteile:

- aa) Verzicht auf organische Lösungsmittel
- bb) geringe Verunreinigungen mit anderen Proteinen
- cc) effiziente Extraktion

30

Es ist auch möglich, MspA zur Aufreinigung in Dimethylsulfoxid bei einer Temperatur im Bereich von 50 - 110 °C zu lösen; danach kann die Lösung vom Rückstand getrennt und MspA durch Abkühlen ausgefällt werden.

Durch heterologe Expression gewonnenes MspA kann durch kann durch Anlegen einer Gleichspannung renaturiert werden. Zweckmäßig ist das Anlegen einer Spannung im Bereich von 50 V für  
5 eine Zeit von etwa 30 Minuten.

Gegenstand der Erfindung ist weiterhin ein kanalbildendes Protein aus einem Gram-positiven Bakterium hergestellt nach dem erfindungsgemäßen Verfahren.  
10

Das Gram-positive Bakterium kann ein Mycolsäure enthaltendes Bakterium sein, wobei zweckmäßigerweise das Bakterium ein Mykobakterium, vorzugsweise *Mycobacterium smegmatis*, ist.

15 Von besonderem Vorteil ist es, daß das kanalbildende Protein ein Porin ist, das insbesondere gegenüber organischen Lösungsmitteln chemisch stabil ist. Das Porin ist vorzugsweise bis zu einer Temperatur von 80°C, vorzugsweise 100°C, thermisch stabil. Es kann sich dabei um das Porin MspA handeln.  
20 Es ist aber auch denkbar, daß weitere hier nicht genannte Porine diese Eigenschaften aufweisen und damit vom Gegenstand der vorliegenden Erfindung umfaßt sind.

Die erfindungsgemäßen kanalbildenden Proteine haben die folgenden Vorteile:  
25

aaa) Sie lassen sich in organischen Lösungsmittel (z. B.  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ ) lösen, ohne zu denaturieren. Die Fähigkeit zur Kanalbildung bleibt in organischen Lösungsmitteln erhalten.  
30

bbb) Sie lassen sich mit Aceton fällen, ohne zu denaturieren.

ccc) Sie überstehen selbst Kochen in Detergentien (z. B. 10 min in 3% SDS), ohne zu denaturieren.

Diese extreme Stabilität der erfindungsgemäßen Proteine gegenüber chemischer und thermischer Denaturierung ermöglicht deren Verwendung zur Herstellung von technisch verwertbaren Nanostrukturen.

Nach Maßgabe der Erfindung wird weiterhin beansprucht ein Gen kodierend für ein kanalbildendes Protein, vorzugsweise ein Porin, aus Gram-positiven Bakterien. Das Gen kann das mspA-Gen gemäß Sequenz 1 sein.

Als weiterer Gegenstand kommt auch ein mutiertes mspA-Gen in Betracht, wobei die Mutation im wesentlichen in einer Angleichung der Codons von mspA an die Codons der in *E.coli* hoch exprimierten Gene besteht. Die Mutation kann im wesentlichen darin bestehen, daß der GC-Gehalt auf weniger als 66% vermindert ist. Die Mutation kann aber auch so ausgebildet sein, daß die chemische und thermische Stabilität sowie die kanalartige Struktur des exprimierten Proteins im wesentlichen der von MspA entspricht. Weitere hier nicht genannte Mutationen sind für den Fachmann ebenfalls denkbar. Gene, die zur Ausbildung der erfindungsgemäßen kanalartigen Proteine führen, sind vom beanspruchten Schutzzumfang umfaßt. Z.B. ein mutiertes mspA-Gen, wobei das mutierte Gen das synmspA-Gen gemäß Sequenz 4 (siehe unten) ist.

Nachfolgend werden anhand der Figuren Beispiele der Erfindung erläutert. Es zeigen:

Fig. 1 die Reinigung von MspA aus *M. smegmatis* in chromatographischer Darstellung,

Fig. 2 die Reinigung von MspA aus *E. coli* in chromatographischer Darstellung,

Fig. 3 die Konstruktion des Plasmidvektors pMN501,

Fig. 4 eine schematische Ansicht einer Vorrichtung zur Renaturierung und

Fig. 5 ein renaturiertes MspA in chromatographischer Darstellung.

Fig. 1 zeigt die Reinigung des Kanalproteins MspA aus *M. smegmatis*. Die Proteine wurden mit einem 10 %igen SDS-Polyacrylamidgel nach getrennt. Das Gel wurde mit Coomassie Blue gefärbt. Spuren: (M) Massenstandard: 200, 116, 97, 66, 55, 36.5, 31, 21.5, 14.4 kDa; (1) Extrakt von *M. smegmatis* mit PLD12-Puffer PLD012-Puffer (100 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pH 6.5, 150 mM NaCl, 0.12 % LDAO). (2) 33 µg aufgereinigtes MspA. Die Proben wurden 30 min bei 37 °C inkubiert, bevor sie auf das Gel aufgetragen wurden. Die Sequenz von MspA, MspA + Promotor sowie MspA mit vermuteter Signalsequenz ist in den Sequenzprotokollen 1 - 3 wiedergeben.

Fig. 2 zeigt die Reinigung des Kanalproteins MspA aus *E. coli*. Die Proteine wurden mit einem 10 %igen SDS-Polyacrylamidgel. Das Gel wurde mit Coomassie Blue gefärbt. Spuren: (1) Lysat von *E. coli* BL21(DE3)/pMN501 vor der Induktion durch IPTG. (2) Lysat von *E. coli* BL21(DE3)/pMN501 nach der Induktion durch IPTG. (3) Massenstandard: 200, 116, 97, 66, 55, 36.5, 31, 21.5, 14.4 kDa. Die Proben wurden 30 min bei 37 °C inkubiert, bevor sie auf das Gel aufgetragen wurden.

In Fig. 3 ist schematisch die Konstruktion des Plasmids pMN501 zur Überexpression von MspA in *E. coli* BL21(DE3) dargestellt. Die verwendeten Abkürzungen bedeuten:

- lacI: Gen codierend für den Laktose-Repressor  
 nptI: Gen codierend für die Neomycinphosphotransferase; sie vermittelt Kanamycinresistenz  
 5 Ori: Replikationsursprung  
 RBS: Ribosomenbindestelle

Fig. 4 zeigt schematisch eine Vorrichtung zur Renaturierung von monomerem MspA. Eine Pipettenspitze aus Polyethylen von 5 cm Länge, dessen unteres Ende nach ca. 2 mm abgeschnitten wurde, wurde mit einer 1.7 %igen Agarose-Lösung (in TAE-Puffer) gefüllt. Eine Bleistiftmine (Typ: Eberhard Faber, 3H) wurde auf eine Länge von 5 cm gekürzt. Ein Polypropylengefäß ohne Deckel wurde mit 60 µl einer Lösung mit 5 µg denaturiertem MspA gefüllt und die Pipettenspitze und die Bleistiftmine in die Lösung gestellt. Dann wurde die Pipettenspitze als Kathode und die Bleistiftmine als Anode angeschlossen.

Fig. 5 zeigt die Renaturierung von denaturiertem MspA. Die Proteine wurden mit einem 10 %igen SDS-Polyacrylamidgel nach (Schägger, H. and von Jagow, G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. Anal Biochem 166, 368-79 (1987)) getrennt. Das Gel wurde mit Silber gefärbt. Spuren: (M) Massenstandard: 116, 97, 66, 55, 36.5, 31, 21.5, 14.4 kDa; (1) 800 ng denaturiertes MspA (2) 800 ng MspA nach der Renaturierungsreaktion. Die Proben wurden 30 min bei 37 °C inkubiert, bevor sie auf das Gel aufgetragen wurden.

30

#### Beispiel 1: Aufreinigung von MspA aus *M. smegmatis*.

Zwei Liter 7H9-Medium mit 0.05 % Tween 80 und 0.2 % Glycerin werden mit *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 beimpft und 2 Tage bei 37°C geschüttelt (Jacobs, W. R., Jr., Kalpana, G. V., Cirillo, J.

10  
D., Pascopella, L., Snapper, S. B., Udani, R. A., Jones, W., Barletta, R. G. and Bloom, B. R. Genetic systems for mycobacteria. *Methods Enzymol* **204**, 537-55 (1991)).

5 7.9 g Zellen (Naßgewicht) werden nach Zentrifugation für 10 min bei 10000 g erhalten und in 28 mL PLD012-Puffer (100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 6.5, 150 mM NaCl, 0.12 % LDAO) resuspendiert und 30 Minuten im Wasserbad gekocht. Dieser Rohextrakt wird mit 28 mL Aceton gefällt, der Niederschlag in  
10 8 mL ALD012-Puffer Puffer (25 mM Hepes, pH 7.5, 10 mM NaCl, 0.12 % LDAO) aufgenommen und über eine G25-Säule mit demselben Puffer entsalzt. Die Protein-enthaltenden Fraktionen werden vereinigt und an einem Anionenaustauscher (POROS HQ20) mit einem linearen NaCl-Gradienten von 10 mM bis 2 M NaCl getrennt.  
15 Natives MspA (100 kDa) eluiert bei 680 mM NaCl. Die Ausbeute beträgt 670 µg MspA mit einer Reinheit von über 90 % (s. Fig. 1).

#### 20 Beispiel 2: Verfahren zur Präparation des Kanalproteins MspA aus E. coli

Zur weiteren Erhöhung der Ausbeute an MspA wird eine Überexpression des entsprechenden Gens vorgeschlagen. Zunächst wird das *mspA*-Gen kloniert, das für das Kanalprotein MspA aus *Mycobacterium smegmatis* mc<sup>2</sup>155 kodiert. Es wird das T7-  
25 Expressionssystem für die Überexpression des *mspA*-Gens gewählt.

Das *mspA*-Gen wird aus dem Plasmid pPOR6 über PCR amplifiziert. In der nativen *mspA*-Sequenz werden alle Codons verändert, die in stark exprimierten Genen aus *Escherichia coli*  
30 selten vorkommen. Im Sequenzprotokoll 4 (siehe unten), sind alle eingeführten Mutationen aufgelistet. Diese *synmspA* genannte DNA wird nach der Methode von Stemmer (Stemmer, W. P.,

11

Cramer, A., Ha, K. D., Brennan, T. M. and Heyneker, H. L. Single-step assembly of a gene and entire plasmid from large numbers of oligodeoxyribonucleotides. *Gene* **164**, 49-53 (1995)) durch Assemblierung von Oligonucleotiden synthetisiert und anstelle des *mshA*-Gens in den Vektor pMN500 eingesetzt. Das resultierende Plasmid pMN501 (Fig.3) vermittelt in Zellen von *E. coli* BL21(DE3) eine starke Expression von denaturiertem MshA-Monomer (20 kDa) nach Induktion mit IPTG. Das so exprimierte MshA kann dem Sequenzprotokoll 5 (siehe unten) entnommen werden

#### Beispiel 3: Aufreinigung von MshA aus *E. coli*

Ein Liter LB-Medium mit 30 µg/mL Kanamycin wird mit *E. coli* BL21(DE3)/pMN500 beimpft und bei 37°C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0.6 geschüttelt. Dann wird mit 1 mM IPTG induziert und die Zellen noch sechs Stunden bei 37°C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 2.2 geschüttelt. Die Zellen werden in 40 mL A-Puffer (25 mM HEPES, pH 7.5, 10 mM NaCl) resuspendiert und durch zehnmütiges Kochen in Wasser aufgeschlossen. Nach einer zehnmütigen Inkubation auf Eis werden die Zelltrümmer und die ausgefallenen Proteine durch Zentrifugation bei 10000 g für 10 min abgetrennt. Der Überstand wird an einem Anionenaustauscher (POROS HQ20) mit einem linearen NaCl-Gradienten von 10 mM bis 2 M NaCl getrennt. Denaturiertes MshA eluiert bei 350 mM NaCl. Um höhermolekulare Proteine abzutrennen, werden die Fraktionen mit MshA vereinigt und eine Gelfiltration durchgeführt. Die Ausbeute beträgt 10 mg MshA mit einer Reinheit von über 95 % (Daten nicht gezeigt).

#### Beispiel 4: Elektrochemische Assemblierung des Kanalproteins MshA

Durch die Überexpression von MshA in *E. coli* ist es zwar leicht möglich, das Kanalprotein mit einer guten Ausbeute zu isolieren. Das gewonnene Protein liegt zum großen Teil in in-

12

aktiver Form vor. Die Überführung in die aktive Form bzw. Renaturierung von monomerem MspA kann nach folgendem Protokoll erfolgen:

- 5 Die Renaturierung findet in einer speziell für diesen Zweck entwickelten Apparatur statt (Fig. 4). Die Renaturierungsreaktion wird mit 5 µg MspA in monomerer Form in dieser Reaktionsapparatur durch Anlegen einer Spannung von 50 V für 30 min durchgeführt. Zum Schluß wird die Spannung für fünf  
10 Sekunden umgepolt, um an der Bleistiftmine adsorbiertes Porin wieder zu lösen.

- Das Protein wird nach der oben beschriebenen Renaturierungsreaktion in einem Proteingel untersucht (s. Fig. 5). Dabei  
15 stellt sich heraus, daß ein großer Teil des Proteins zu oligomeren Einheiten assembliert ist. Durch Rekonstitutionsexperimente kann gezeigt werden, daß das MspA in dieser Form wieder hohe Kanalaktivität besitzt. Das beweist, daß die Renaturierung von MspA durch geringe Gleichspannungen möglich ist.

20

Diese Renaturierungsreaktion ist sehr einfach durchzuführen und ist damit ein wichtiger Bestandteil der Präparation von funktionalem Kanalprotein MspA aus überproduzierenden *E. coli*.

13

Liste der Sequenzprotokolle:

1. mspA-Gen, translatiert
- 5 2. mspA-Gen + Promotor, translatiert
3. MspA-Proteins mit vermuteter Signalsequenz
4. synmspA-Gen, translatiert
- 10 5. rMspA-Protein

14  
SEQUENZPROTOKOLLE

<110> Niederweis Dr., Michael  
Bossmann Dr., Stefan

5 <120> Synthese von Nanostrukturen mit Kanalproteinen

<130> MN01

10 <140>  
<141>

<160> 5

15 <170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1  
<211> 636  
<212> DNA  
20 <213> Mycobacterium smegmatis

<220>  
<221> CDS  
<222> (1)..(636)  
25 <223> mspA-Gen

<400> 1

atg aag gca atc agt cgg gtg ctg atc gcg atg gtt gca gcc atc gcg	48
Met Lys Ala Ile Ser Arg Val Leu Ile Ala Met Val Ala Ala Ile Ala	
1 5 10 15	
gcg ctt ttc acg agc aca ggc acc tct cac gca ggc ctg gac aac gag	96
Ala Leu Phe Thr Ser Thr Gly Thr Ser His Ala Gly Leu Asp Asn Glu	
20 25 30	
ctg agc ctc gtt gat ggc cag gac cgc acc ctc acc gtg cag cag tgg	144
Leu Ser Leu Val Asp Gly Gln Asp Arg Thr Leu Thr Val Gln Gln Trp	
35 40 45	
gac acc ttc ctc aat ggt gtg ttc ccc ctg gac cgc aac cgt ctt acc	192
Asp Thr Phe Leu Asn Gly Val Phe Pro Leu Asp Arg Asn Arg Leu Thr	
50 55 60	
cgt gag tgg ttc cac tcc ggt cgc gcc aag tac atc gtg gcc ggc ccc	240
Arg Glu Trp Phe His Ser Gly Arg Ala Lys Tyr Ile Val Ala Gly Pro	
65 70 75 80	
ggt gcc gac gag ttc gag ggc acg ctg gaa ctc ggc tac cag atc ggc	288
Gly Ala Asp Glu Phe Glu Gly Thr Leu Glu Leu Gly Tyr Gln Ile Gly	
85 90 95	
ttc ccg tgg tcg ctg ggt gtg ggc atc aac ttc agc tac acc acc ccg	336
Phe Pro Trp Ser Leu Gly Val Gly Ile Asn Phe Ser Tyr Thr Pro	
100 105 110	
aac atc ctg atc gac gac ggt gac atc acc gct ccg ccg ttc ggc ctg	384
Asn Ile Leu Ile Asp Asp Gly Asp Ile Thr Ala Pro Pro Phe Gly Leu	
115 120 125	
aac tcg gtc atc acc ccg aac ctg ttc ccc ggt gtg tcg atc tcg gca	432
Asn Ser Val Ile Thr Pro Asn Leu Phe Pro Gly Val Ser Ile Ser Ala	
130 135 140	

15

	gat	ctg	ggc	aac	ggc	ccc	ggc	atc	cag	gaa	gtc	gca	acg	ttc	tcg	gtc	480
	Asp	Leu	Gly	Asn	Gly	Pro	Gly	Ile	Gln	Glu	Val	Ala	Thr	Phe	Ser	Val	
	145					150					155					160	
5	gac	gtc	tcc	ggc	gcc	gag	ggt	ggc	gtg	gcc	gtg	tcg	aac	gcc	cac	ggc	528
	Asp	Val	Ser	Gly	Ala	Glu	Gly	Gly	Val	Ala	Val	Ser	Asn	Ala	His	Gly	
					165					170					175		
10	acc	gtg	acc	ggt	gcg	gcc	ggc	ggt	gtg	ctg	ctg	cgt	ccg	ttc	gcc	cgc	576
	Thr	Val	Thr		Gly	Ala	Ala	Gly	Gly	Val	Leu	Leu	Arg	Pro	Phe	Ala	Arg
					180					185					190		
15	ctg	atc	gcc	tcg	acc	ggt	gac	tcg	gtc	acc	acc	tac	ggc	gaa	ccc	tgg	624
	Leu	Ile	Ala	Ser	Thr	Gly	Asp	Ser	Val	Thr	Thr	Tyr	Gly	Glu	Pro	Trp	
			195					200					205				
20	aac	atg	aac	tga													636
	Asn	Met	Asn														
			210														

16

```

<210> 2
<211> 1423
<212> DNA
<213> Mycobacterium smegmatis
5
<220>
<221> -10_signal
<222> (323)..(328)
<223> vermuteter Promotor
10
<220>
<221> CDS
<222> (499)..(1134)
<223> mspA-Gen
15
<220>
<221> RBS
<222> (492)..(496)
<223> vermutete Ribosomenbindestelle
20
<400> 2
gttaacggag tcgggccgtc gatacggcgg cgaagatcat ccggcagatt ggccgctggg 60
taaaccgcgcg taaacactgg taccgccggg ccggcccgga aaagggttttg cctcacggtg 120
aatatgtgac ctgaattgca cttcacgggt aaaagccggag gtaaccgacg gttgccgcag 180
caccctcaca gcttggggcca aggtgacgtg cagcgcacgc ctgccgggtgc cggatggcgg 240
tcaccgcaaa gtgtcaggca ctgccgaaag gtcagtcagc aaacttcact gcggctgtgg 300
tgccaagtgc ggttgtggga cgtatccgtt gctgccgcgc gccctggcgt ttatgtttct 360
gctgccaaact gtgagcggag cattagagac agatgtgac ctcttagatc tccgaagtct 420
35
ctgaacaggt gttgagccgg ttgcagacaa caaacaggt ggccctgagg ggccgcccgc 480
gatacagtta gggagaac atg aag gca atc agt cgg gtg ctg atc gcg atg 531
Mat Lys Ala Ile Ser Arg Val Leu Ile Ala Met
1 5 10
40
gtt gca gcc atc gcg gcg ctt ttc acg agc aca ggc acc tct cac gca 579
Val Ala Ala Ile Ala Ala Leu Phe Thr Ser Thr Gly Thr Ser His Ala
15 20 25
45
ggc ctg gac aac gag ctg agc ctc gtt gat ggc cag gac cgc acc ctc 627
Gly Leu Asp Asn Glu Leu Ser Leu Val Asp Gly Gln Asp Arg Thr Leu
30 35 40
50
acc gtg cag cag tgg gac acc ttc ctc aat ggt gtg ttc ccc ctg gac 675
Thr Val Gln Gln Trp Asp Thr Phe Leu Asn Gly Val Phe Pro Leu Asp
45 50 55
55
cgc aac cgt ctt acc cgt gag tgg ttc cac tcc ggt cgc gcc aag tac 723
Arg Asn Arg Leu Thr Arg Glu Trp Phe His Ser Gly Arg Ala Lys Tyr
60 65 70 75
60
atc gtg gcc ggc ccc ggt gcc gac gag ttc gag ggc acg ctg gaa ctc 771
Ile Val Ala Gly Pro Gly Ala Asp Glu Phe Glu Gly Thr Leu Glu Leu
80 85 90
ggc tac cag atc ggc ttc ccg tgg tgg ctg ggt gtg ggc atc aac ttc 819

```

17

	Gly	Tyr	Gln	Ile	Gly	Phe	Pro	Trp	Ser	Leu	Gly	Val	Gly	Ile	Asn	Phe	
	95								100					105			
5	agc	tac	acc	acc	ccg	aac	atc	ctg	atc	gac	gac	ggc	gac	atc	acc	gct	867
	Ser	Tyr	Thr	Thr	Pro	Asn	Ile	Leu	Ile	Asp	Asp	Gly	Asp	Ile	Thr	Ala	
			110					115					120				
10	ccg	ccg	ttc	ggc	ctg	aac	tcg	gtc	atc	acc	ccg	aac	ctg	ttc	ccc	ggc	915
	Pro	Pro	Phe	Gly	Leu	Asn	Ser	Val	Ile	Thr	Pro	Asn	Leu	Phe	Pro	Gly	
			125				130					135					
15	gtg	tcg	atc	tcg	gca	gat	ctg	ggc	aac	ggc	ccc	ggc	atc	cag	gaa	gtc	963
	Val	Ser	Ile	Ser	Ala	Asp	Leu	Gly	Asn	Gly	Pro	Gly	Ile	Gln	Glu	Val	
	140					145					150					155	
20	gca	acg	ttc	tcg	gtc	gac	gtc	tcg	ggc	gcc	gag	ggc	ggc	gtg	gcc	gtg	1011
	Ala	Thr	Phe	Ser	Val	Asp	Val	Ser	Gly	Ala	Glu	Gly	Gly	Val	Ala	Val	
					160					165					170		
25	tcg	aac	gcc	cac	ggc	acc	gtg	acc	ggc	gcc	ggc	ggc	ggc	gtg	ctg	ctg	1059
	Ser	Asn	Ala	His	Gly	Thr	Val	Thr	Gly	Ala	Ala	Gly	Gly	Val	Leu	Leu	
				175					180					185			
30	cgt	ccg	ttc	gcc	cgc	ctg	atc	gcc	tcg	acc	ggc	gac	tcg	gtc	acc	acc	1107
	Arg	Pro	Phe	Ala	Arg	Leu	Ile	Ala	Ser	Thr	Gly	Asp	Ser	Val	Thr	Thr	
			190					195					200				
35	tac	ggc	gaa	ccc	tgg	aac	atg	aac	tga	ttcctggacc	gccgttcggc						1154
	Tyr	Gly	Glu	Pro	Trp	Asn	Met	Asn									
		205				210											
40	cgctgagacc	gcttgagatc	ggcgcgtccc	gctcccggtg	tcgtcagctc	atcgctgaca											1214
	cgtgaactga	cactcttctc	agccggagcg	kacgcgcga	tcttggttc	tgagcagttc											1274
	tcagtcgctc	cgccgcaaca	ccagcgtga	cggcgtacgc	agcctgccc	ccaccgcgcg											1334
	ccagggacgc	cccagcctgg	gcaccacctc	agcggtcggc	acgatgcgcg	gatcggtcac											1394
	ctcgaacgtc	tcaccgttca	tcaccgcgc														1423

18

<210> 3  
 <211> 211  
 <212> PRT  
 <213> Mycobacterium smegmatis  
 5  
 <220>  
 <221> SIGNAL  
 <222> (1)..(27)  
 <223> vermutete Signalsequenz des MspA-Proteins  
 10  
 <220>  
 <221> PEPTIDE  
 <222> (28)..(211)  
 <223> reifes MspA-Protein  
 15  
 <400> 3  
 Met Lys Ala Ile Ser Arg Val Leu Ile Ala Met Val Ala Ala Ile Ala  
 1 5 10 15  
 20 Ala Leu Phe Thr Ser Thr Gly Thr Ser His Ala Gly Leu Asp Asn Glu  
 20 25 30  
 Leu Ser Leu Val Asp Gly Gln Asp Arg Thr Leu Thr Val Gln Gln Trp  
 35 40 45  
 25 Asp Thr Phe Leu Asn Gly Val Phe Pro Leu Asp Arg Asn Arg Leu Thr  
 50 55 60  
 30 Arg Glu Trp Phe His Ser Gly Arg Ala Lys Tyr Ile Val Ala Gly Pro  
 65 70 75 80  
 Gly Ala Asp Glu Phe Glu Gly Thr Leu Glu Leu Gly Tyr Gln Ile Gly  
 85 90 95  
 35 Phe Pro Trp Ser Leu Gly Val Gly Ile Asn Phe Ser Tyr Thr Thr Pro  
 100 105 110  
 Asn Ile Leu Ile Asp Asp Gly Asp Ile Thr Ala Pro Pro Phe Gly Leu  
 115 120 125  
 40 Asn Ser Val Ile Thr Pro Asn Leu Phe Pro Gly Val Ser Ile Ser Ala  
 130 135 140  
 45 Asp Leu Gly Asn Gly Pro Gly Ile Gln Glu Val Ala Thr Phe Ser Val  
 145 150 155 160  
 Asp Val Ser Gly Ala Glu Gly Gly Val Ala Val Ser Asn Ala His Gly  
 165 170 175  
 50 Thr Val Thr Gly Ala Ala Gly Gly Val Leu Leu Arg Pro Phe Ala Arg  
 180 185 190  
 Leu Ile Ala Ser Thr Gly Asp Ser Val Thr Thr Tyr Gly Glu Pro Trp  
 195 200 205  
 55 Asn Met Asn  
 210  
 60

19

<210> 4  
 <211> 558  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz

5

<220>  
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:synthetisch

10

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(558)  
 <223> synmspA-Gen

15

<400> 4  
 atg ggc ctg gac aac gaa ctg tcc ctg gtt gac ggc cag gac cgt acc 48  
 Met Gly Leu Asp Asn Glu Leu Ser Leu Val Asp Gly Gln Asp Arg Thr  
 1 5 10 15

20

ctg acc gtr cag cag tgg gac acc ttc ctg aac ggt gtt ttc ccg ctg 96  
 Leu Thr Val Gln Gln Trp Asp Thr Phe Leu Asn Gly Val Phe Pro Leu  
 20 25 30

25

gac cgt aac cgt ctg acc cgt gaa tgg ttc cac tcc ggt cgt gcg aaa 144  
 Asp Arg Asn Arg Leu Thr Arg Glu Trp Phe His Ser Gly Arg Ala Lys  
 35 40 45

30

tac atc gtt gcg ggt ccg ggt gcg gac gag ttc gaa ggt acc ctg gaa 192  
 Tyr Ile Val Ala Gly Pro Gly Ala Asp Glu Phe Glu Gly Thr Leu Glu  
 50 55 60

35

ctg ggt tac cag atc ggc ttc ccg tgg tcc ctg ggt gtt ggt atc aac 240  
 Leu Gly Tyr Gln Ile Gly Phe Pro Trp Ser Leu Gly Val Gly Ile Asn  
 65 70 75 80

40

ttc tct tac acc acc ccg aac atc ctg atc gac gac ggt gac atc acc 288  
 Phe Ser Tyr Thr Thr Pro Asn Ile Leu Ile Asp Asp Gly Asp Ile Thr  
 85 90 95

45

gct ccg ccg ttc ggt ctg aac tct gtt atc acc ccg aac ctg ttc ccg 336  
 Ala Pro Pro Phe Gly Leu Asn Ser Val Ile Thr Pro Asn Leu Phe Pro  
 100 105 110

50

ggt gtt tct atc tct gct gat ctg ggc aac ggt ccg ggt atc cag gaa 384  
 Gly Val Ser Ile Ser Ala Asp Leu Gly Asn Gly Pro Gly Ile Gln Glu  
 115 120 125

55

gtt gct acc ttc tct gta gac gtc tct ggt gct gaa ggt ggt gtt gct 432  
 Val Ala Thr Phe Ser Val Asp Val Ser Gly Ala Glu Gly Gly Val Ala  
 130 135 140

60

gtt tct aac gct cac ggc acc gtt acc ggt gcg gct ggc ggt gtt ctg 480  
 Val Ser Asn Ala His Gly Thr Val Thr Gly Ala Ala Gly Gly Val Leu  
 145 150 155 160

55

ctg cgt ccg ttc gct cgt ctg atc gct tct acc ggt gac tct gtt acc 528  
 Leu Arg Pro Phe Ala Arg Leu Ile Ala Ser Thr Gly Asp Ser Val Thr  
 165 170 175

60

acc tac ggt gaa ccg tgg aac atg aac tga 558  
 Thr Tyr Gly Glu Pro Trp Asn Met Asn  
 180 185

20

<210> 5  
 <211> 185  
 <212> PRT  
 <213> Künstliche Sequenz  
 5  
 <220>  
 <221> PEPTIDE  
 <222> (1)..(184)  
 <223> rMspA  
 10  
 <220>  
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:synthetisch  
 <400> 5  
 15 Met Gly Leu Asp Asn Glu Leu Ser Leu Val Asp Gly Gln Asp Arg Thr  
     1                    5                    10                    15  
 Leu Thr Val Gln Gln Trp Asp Thr Phe Leu Asn Gly Val Phe Pro Leu  
                     20                    25                    30  
 20 Asp Arg Asn Arg Leu Thr Arg Glu Trp Phe His Ser Gly Arg Ala Lys  
                     35                    40                    45  
 Tyr Ile Val Ala Gly Pro Gly Ala Asp Glu Phe Glu Gly Thr Leu Glu  
 25                    50                    55                    60  
 Leu Gly Tyr Gln Ile Gly Phe Pro Trp Ser Leu Gly Val Gly Ile Asn  
     65                    70                    75                    80  
 30 Phe Ser Tyr Thr Thr Pro Asn Ile Leu Ile Asp Asp Gly Asp Ile Thr  
                     85                    90                    95  
 Ala Pro Pro Phe Gly Leu Asn Ser Val Ile Thr Pro Asn Leu Phe Pro  
                     100                    105                    110  
 35 Gly Val Ser Ile Ser Ala Asp Leu Gly Asn Gly Pro Gly Ile Gln Glu  
                     115                    120                    125  
 Val Ala Thr Phe Ser Val Asp Val Ser Gly Ala Glu Gly Gly Val Ala  
 40                    130                    135                    140  
 Val Ser Asn Ala His Gly Thr Val Thr Gly Ala Ala Gly Gly Val Leu  
     145                    150                    155                    160  
 45 Leu Arg Pro Phe Ala Arg Leu Ile Ala Ser Thr Gly Asp Ser Val Thr  
                     165                    170                    175  
 Thr Tyr Gly Glu Pro Trp Asn Met Asn  
                     180                    185  
 50

## Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung eines in Gram-positiven Bakte-  
rien vorkommenden kanalbildenden Proteins, wobei das kanal-  
bildende Protein durch heterologe Expression oder durch Auf-  
reinigung aus Mycobakterien gewonnen wird.
2. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei  
das Gram-positive Bakterium ein mindestens eine Mycolsäure  
enthaltendes Bakterium ist.
3. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei  
das Bakterium ein Mykobakterium, vorzugsweise *Mycobacterium  
smegmatis*, ist.
4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei  
das kanalbildende Protein ein Porin ist.
5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei  
das Porin gegenüber organischen Lösungsmitteln chemisch sta-  
bil ist.
6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei  
das Porin bis zu einer Temperatur von 80°C, vorzugsweise  
100°C, thermisch stabil ist.
7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei  
das Porin MspA ist.
8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei  
die heterologe Expression in *E.coli* durchgeführt wird.
9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei  
das kanalbildende Protein durch Überexpression, vorzugsweise  
aus *E.coli* oder Mycobakterien, gewonnen wird.

10. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei zur Expression ein für ein kanalbildendes Protein, vorzugsweise ein Porin, codierendes Gen benutzt wird.
- 5
11. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei zur Expression ein mspA-Gen gemäß Sequenz 1 benutzt wird.
12. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei  
10 zur Expression ein von der Sequenz 1 abgeleitetes mutiertes Gen benutzt wird, wobei die Mutation so ausgebildet ist, daß die chemische und thermische Stabilität sowie die kanalartige Struktur des expimierten Proteins im wesentlichen denen von MspA entspricht.
- 15
13. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Mutation im wesentlichen in einer Angleichung der Codons von mspA an die Codons der in *E.coli* hoch exprimierten Gene besteht.
- 20
14. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei zur Überexpression ein mutiertes Gen benutzt wird, wobei die Mutation im wesentlichen darin besteht, daß der GC-Gehalt auf weniger als 66% vermindert ist.
- 25
15. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei zur Überexpression das synmspA-Gen gemäß Sequenz 4 benutzt wird.
- 30
16. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei ein zur Überexpression in *E.coli* geeigneter Vektor verwendet wird, in den das synmspA-Gen gemäß Sequenz 4 eingesetzt ist.

23

17. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die kanalbildenden Proteine mittels nicht-ionischer oder zwitterionischer Detergentien aus der Zellwand von Gram-positiven Bakterien gewonnen werden.

5

18. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Detergentien aus der folgenden Gruppe ausgewählt sind: Isotridecylpoly(ethyleneglycolether)<sub>n</sub>, Alkylglucoside, besonders Octylglucosid, Alkylmaltoside, besonders Dodecylmaltosid, Alkylthiogluco-  
 10 sid, Alkylthiogluco-  
 sid, Alkylthiogluco-  
 Polyethylenoxide und Lauyldiamminoxid.

15

19. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Temperatur bei der Extraktion zwischen 80 und 110 °C, vorzugsweise zwischen 90 und 100 °C, beträgt.

20

20. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Extraktionszeit 5 bis 120 Minuten, vorzugsweise 25 - 35 Minuten, beträgt.

25

21. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei ein Puffer mit einer Ionenstärke von mehr als 50 mM NaCl oder Na-Phosphat benutzt wird.

30

22. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei durch heterologe Expression gewonnenes MspA durch Anlegen einer Gleichspannung renaturiert wird.

23. Kanalbildendes Protein aus einem Gram-positiven Bakterium hergestellt nach dem Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche.

24. Gen kodierend für ein kanalbildendes Protein, vorzugsweise ein Porin, aus Gram-positiven Bakterien.

25. mspA-Gen gemäß Sequenz 1.

26. Mutiertes mspA-Gen, wobei die Mutation im wesentlichen  
5 in einer Angleichung der Codons von mspA an die Codons der in  
E.coli hoch exprimierten Gene besteht.

27. Mutiertes mspA-Gen, insbesondere nach Anspruch 26, wobei  
die Mutation im wesentlichen darin besteht, daß der GC-Gehalt  
10 auf weniger als 66% vermindert ist.

28. Mutiertes mspA-Gen, insbesondere nach Anspruch 26 oder  
27, abgeleitet von der Sequenz 1, wobei die Mutation so aus-  
gebildet ist, daß die chemische und thermische Stabilität so-  
15 wie die kanalartige Struktur des exprimierten Proteins im we-  
sentlichen der von MspA entspricht.

29. Mutiertes mspA-Gen nach einem der Ansprüche 26 bis 28,  
wobei das mutierte Gen das synmspA-Gen gemäß Sequenz 4 ist.

20

30. Plasmidvektor pMN501.

31. Überexpressionssystem, bei dem E.coli den Plasmidvektor  
pMN501 enthält.

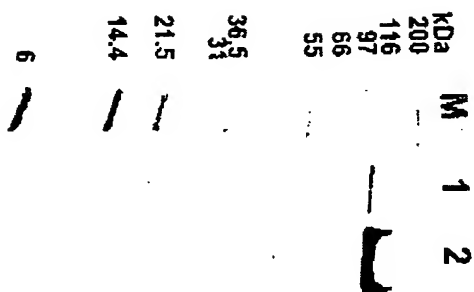


Fig. 1

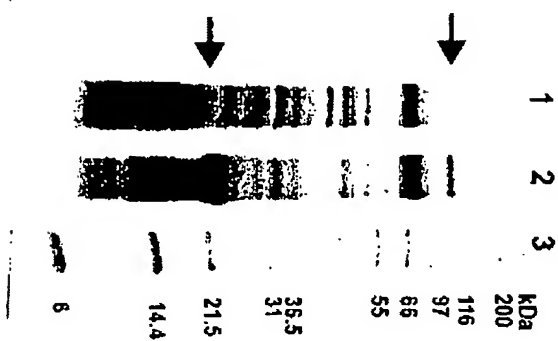


Fig. 2

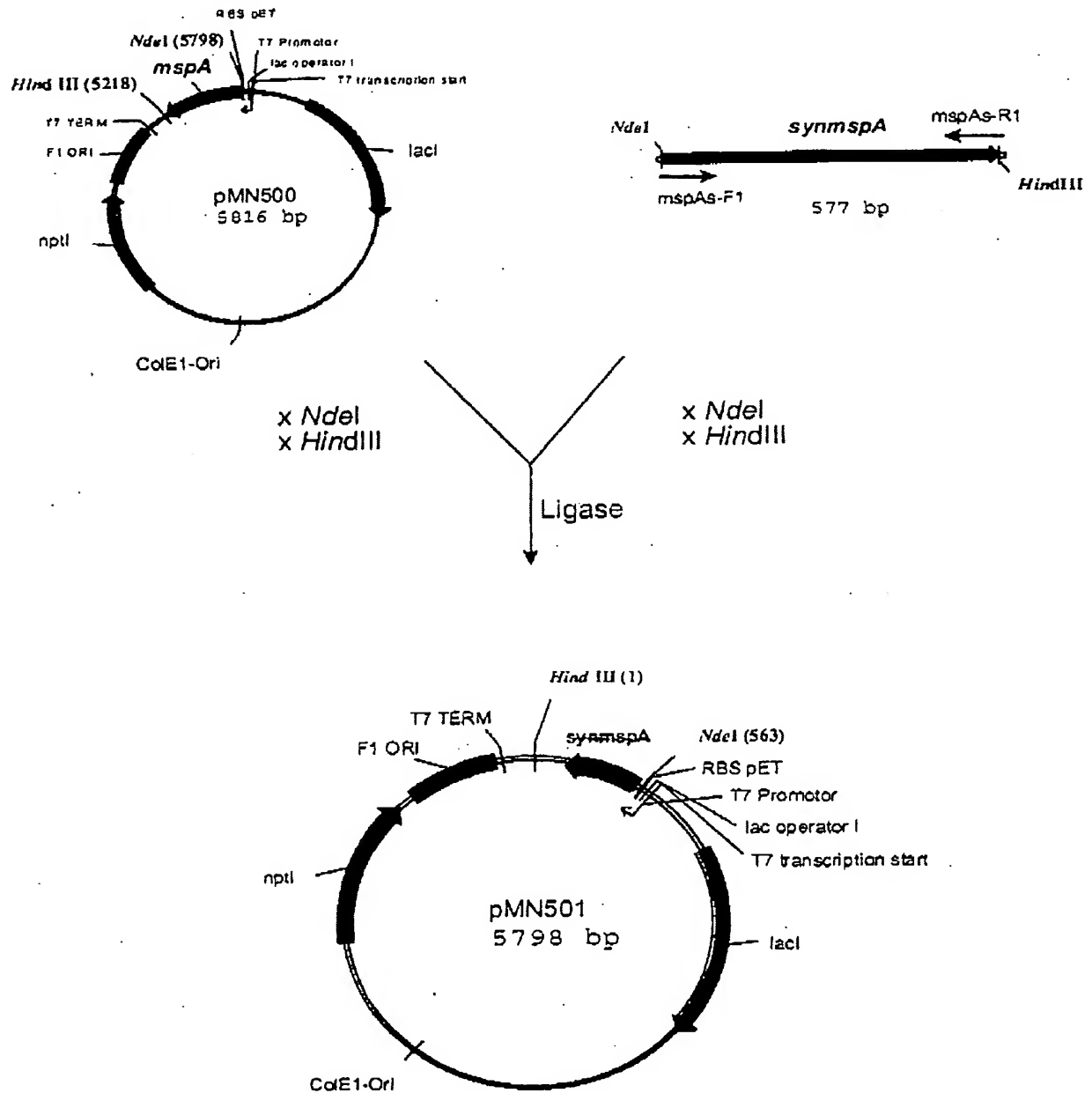


Fig. 3

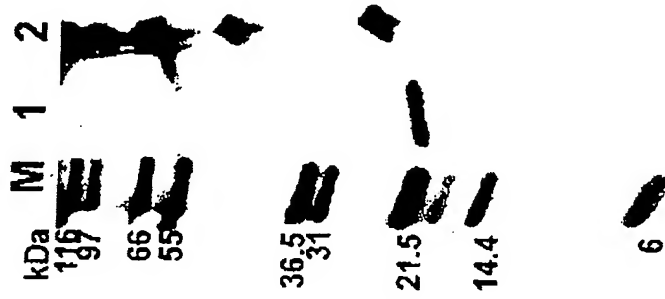


Fig. 5

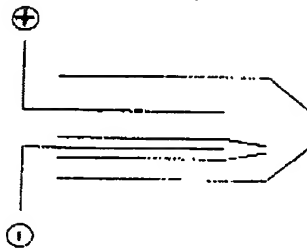


Fig. 4

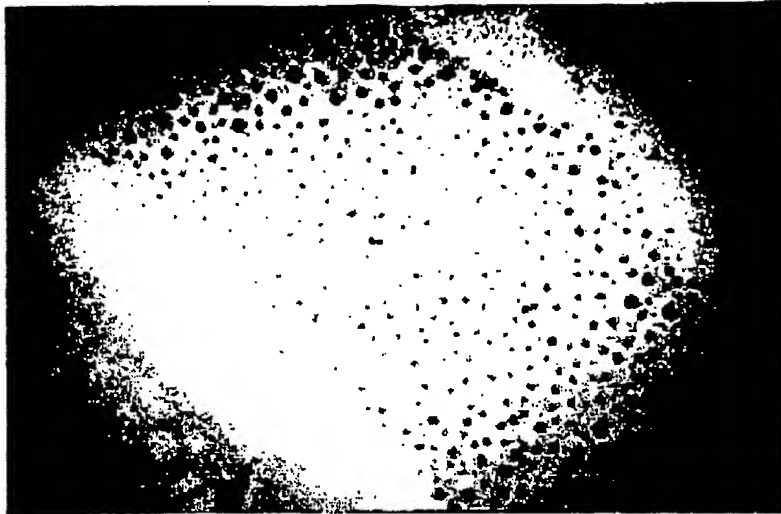


Fig. 6a

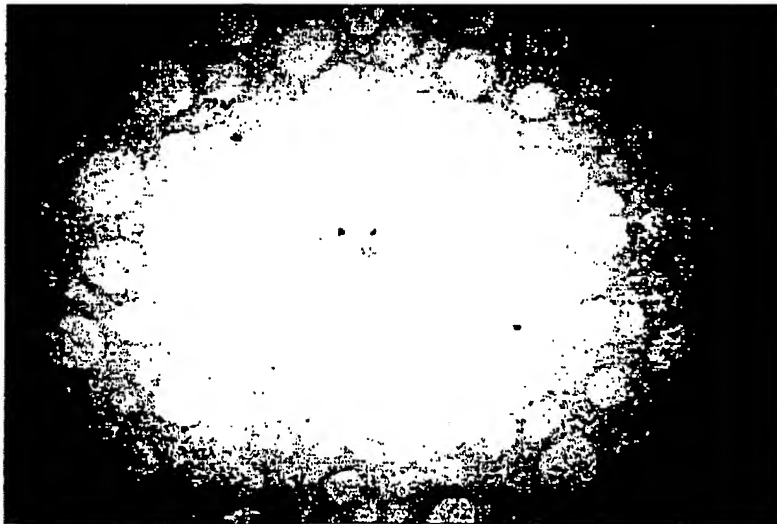


Fig. 6b

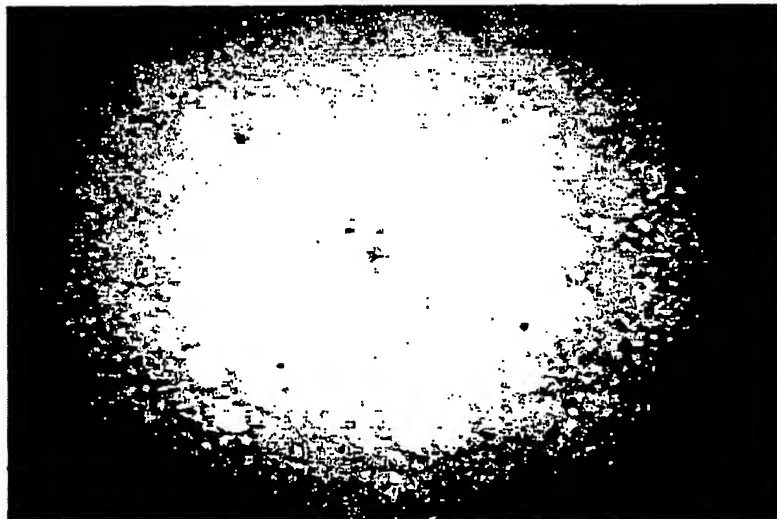


Fig. 6c

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**